

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/00, A01K 67/027, C12N 9/64	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/36510 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00230 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. Januar 1998 (16.01.98) (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AGROBIOGEN GMBH [DE/DE]; Thalmannsdorf 25, Larezhhausen, D-86567 Hilgertshausen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BREM, Gottfried [DE/DE]; Agrobiogen GmbH, Thalmannsdorf 25, Larezhhausen, D-86567 Hilgertshausen (DE). DURCOVA-HILLS, Gabriela [SK/DE]; Bayr. Forschungszentrum f. Reproduktionsbiologie (, BFZF), Hackerstrasse 27, D-85764 Oberschleißheim (DE). MÜLLER, Sigrid [DE/AT]; Institut für Tierzucht und Genetik, Österreich, Joseph Baumann Gasse 1, A-1210 Wien (AT). SCHERNTHANER, Wolfgang [AT/DE]; Bayr. Forschungszentrum f. Reproduktionsbiologie (, BFZF), Hackerstrasse 27, D-85764 Oberschleißheim (DE). WENIGERKIND, Hendrik [DE/AT]; Institut für Tierzucht und Genetik, Österreich, Joseph Baumann Gasse 1, A-1210 Wien (AT). WOLF, Eckhard [DE/AT]; Institut für Tierzucht und Genetik, Österreich, Joseph Baumann Gasse 1, A-1210 Wien (AT). ZAKHARTCHENKO, Valeri [RU/DE]; Bayr. Forschungszentrum f. Reproduktionsbiologie (, BFZF), Hackerstrasse 27, D-85764 Oberschleißheim (DE).	(74) Anwalt: STRAUS, Alexander, Kirschner & Kurig, Sollner Strasse 38, D-81479 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: EFFICIENT NUCLEAR TRANSFER USING FETAL FIBROBLASTS (54) Bezeichnung: EFFIZIENTER KERNTRANSFER MIT FETALEN FIBROBLASTEN (57) Abstract <p>The invention relates to a method for rearing animals by means of cloning and to the animals obtained using said method. The invention especially relates to a method for reproducing animal embryos via an efficient nuclear transfer using fetal fibroblasts comprising the following steps: (a) Obtaining a fetal fibroblast; (b) uniting the nucleus of the fetal fibroblast with a suited recipient cell, whereby the fetal fibroblast is not fixed in the G0 phase by an external manipulation before the union; (c) cultivating the cells obtained in such a manner for a period of time during which a blastozyste forms; and optionally inserting the grown cell cluster in a mother animal.</p> (57) Zusammenfassung <p>Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten von Tieren über Klonierung sowie die mit dem Verfahren erhältlichen Tiere, insbesondere ein Verfahren zur Wiederherstellung tierischer Embryonen über einen effizienten Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten, das die folgenden Schritte umfaßt: a) Gewinnen eines fetalen Fibroblasten, b) Vereinen des Kerns des fetalen Fibroblasten mit einer geeigneten Empfängerzelle, wobei der fetale Fibroblast vor der Vereinigung nicht durch externe Manipulation in der G0 Phase festgesetzt wird, c) Züchten der so erhaltenen Zelle für einen Zeitraum, damit sich eine Blastozyste bildet, und gegebenenfalls d) Einbringen des gewachsenen Zellhaufens in ein Muttertier.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Effizienter Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten von Tieren über Klonierung sowie die mit dem Verfahren erhältlichen Tiere. Diese Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zum Klonieren von Tieren über einen effizienten Kerntransfer mit bestimmten fetalen Zellen.
- 10 Tiere, insbesondere Nutztiere, werden vom Menschen seit langem für die verschiedensten Zwecke weitergezüchtet und im Hinblick auf bestimmte Eigenschaften fortentwickelt. So wurden beispielsweise Kühe und Stiere mit hohem Zuchtwert für Milchleistung weiterverpaart, um Tiere mit hohem Milchertrag zu erhalten.
- 15 In den letzten Jahren gerieten Tiere, insbesondere Vertreter der Ungulaten, wie Schafe, Rinder bzw. Kühe auch als Produktionsstätten ernährungsphysiologisch bzw. pharmazeutisch bedeutender Stoffe in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses, da es mit der Entwicklung der Gentechnologie möglich wurde gezielt Tiere herzustellen, denen eine neue Eigenschaft, beispielsweise die Fähigkeit zur Produktion eines bestimmten Arznei-
- 20 mittels, verliehen werden konnte. Das Problem bei der wirtschaftlichen Nutzung derartiger Tiere besteht jedoch darin, daß das ihnen transferierte Genkonstrukt integriert und stabil an die Nachkommen weitergegeben wird.
- Zu diesem Zweck wurde versucht, das Problem des Gentransfers dadurch zu lösen, daß
- 25 dieser in Zellen vorgenommen wird, wobei aus diesen Zellen mittels Klonierung wieder Tiere generiert werden.
- In der Fachwelt wird der Begriff des "Klonierens" allgemeinen als Vervielfältigung eines genetischen Materials, abgeleitet von einer einzigen Zelle definiert, was übertragen auf die
- 30 Embryologie als Erstellung von Embryonen bzw. Tieren mit identischem Genotyp verstanden werden kann. In der Embryologie wird der Keimling während der Blastogenese, also bis zur Entwicklung der Anlage von Primitivorganen als Embryo, in den nachfolgenden Entwicklungsstufen als Fetus bezeichnet. Embryonale Phasen verlaufen je nach Spezies in unterschiedlich langen Zeiträumen ab, so beispielsweise beim Rind in
- 35 einem Zeitraum von etwa 4 Wochen, wobei bei anderen Spezies innerhalb der Ungulaten kürzere oder auch längere Zeiträume dafür erforderlich sein können.

Zur Klonierung von Tieren, also zur Vervielfältigung eines einem bestimmten Tier eigenen Genotyps wurden bis dato mehrere Wege beschritten.

- 5 Einerseits wurden frühe Embryonalstadien und Fortentwicklungen einem mikrochirurgischen Eingriff unterworfen und die jeweils daraus isolierten Teile wurden in vitro bzw. in vivo weitergezüchtet.

- 10 Weiter wurde eine als "Chimäres Klonen" bezeichnete mikromanipulatorische Kombination asynchroner Entwicklungsstadien durchgeführt, bei der Blastomere(n) aus Embryonen weiter fortgeschrittener Stadien mit Blastomeren aus früheren Stadien zusammengebracht wurden, mit dem Ziel, die erstgenannten in ihrer Weiterentwicklungskapazität zu unterstützen und somit identische Viellinge zu erzeugen. Die größte Anzahl damit erhaltener Klone lag jedoch lediglich in einer Größenordnung von maximal 5-8.

- 15 Eine weitere Vorgehensweise war die parthenogenetische Aktivierung oder die Verpaarung homozygoter Elterntiere, um hinsichtlich bestimmter Eigenschaften Klone zu erhalten.

- 20 Da sich die oben genannten Verfahren hinsichtlich Ihrer Effektivität und Zuverlässigkeit jedoch als relativ schlecht erwiesen, wurde ein weiteres Verfahren entwickelt, das generell als Kerntransfer bezeichnet wird.

- 25 Dabei werden Zellkerne, die von mehrzelligen Embryonen stammen, in entsprechend vorbereitete Eizellen überführt, wobei genetisch identische Embryonen erstellt werden konnten.

Um eine Klonierung mittels Kerntransfer erfolgreich durchführen zu können, müssen jedoch einige unabdingbare Parameter berücksichtigt werden.

- 30 Die Eizelle, die als Empfängerzelle eingesetzt wird, muß das Metaphase-Stadium in der 2. Reifeteilung (Metaphase II) vollendet haben und soll keine eigene nukleare DNA mehr enthalten, d.h. sie soll als sogenannte enukleierte Eizelle vorliegen. Des weiteren sollte das Cytoplasma der Eizelle so wenig wie möglich beeinflusst werden, da die in dem Cytoplasma selbst enthaltenen Stoffe für die Weiterentwicklung, beispielsweise die
35 Teilung der Zelle, von Bedeutung sein können.

Weiterhin muß die nukleare DNA des übertragenen Kerns reprogrammiert werden. Da der (Spender-) Kern von einem mehrzelligen Embryo stammt, hat die jeweilige Spenderzelle

bereits einige Teilungszyklen durchlaufen. Dies bedeutet, daß sich die Zelle in einem gegenüber einer totipotenten befruchteten Eizelle fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befindet, in dem möglicherweise bereits bestimmte, für die frühe Entwicklung erforderliche Gene abgeschaltet sind.

5

Aus diesem Grund muß die verwendete Kern-DNA derart reprogrammiert werden, daß die vollständige genetische Information der Kern-DNA wieder zur Verfügung steht und das Teilungsschema des Embryos wieder beim Stadium der Zygote beginnt. Je besser somit diese Reprogrammierung bzw. Aktivierung erreicht werden kann, desto höher liegt die
10 Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Klonierung, mit der dann auch ein fertig entwickeltes, d.h. lebend geborenes geklontes Tier erhalten werden kann.

Neben der Kern-DNA ist u.a. auch die in dem Cytoplasma vorhandene mRNA von Bedeutung, da diese im Zeitpunkt der Vereinigung von Eizelle und Spenderzelle die für
15 das gegenwärtige Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstadium der Spenderzelle erforderlichen Botschaften darstellt und die damit hergestellten Proteine einen Einfluß auf die weitere Entwicklung der Zelle nehmen können.

Das Verfahren des Kerntransfers wurde bereits mit bescheidenem Erfolg eingesetzt. So
20 berichteten Willadsen et al. (Nature 320 (1986), 63-65) über die Klonierung von Lämmern, wobei die Kerne aus Kern-Spenderzellen aus dem 8-Zell-Stadium stammten. Robl et al. (J. Anim. Sci. 64 (1987), 642-647) berichteten über die ersten Kerntransferexperimente beim Rind, wobei ausschließlich mit ex vivo gewonnenen Rinderembryonen als Kernspender gearbeitet wurde. Bei diesen Versuchen war immer eine in vivo
25 Zwischenkultur in Schafeileitern erforderlich. In den folgenden Jahren konnte auch gezeigt werden, daß das Embryonalklonen beim Rind rein in vitro, also unter Verwendung von in vitro produzierten Embryonen und in vitro gereiften Eizellen, erfolgreich durchgeführt werden kann (Sims et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1991), 6143-6147).

30 In der WO 97/07668 wird weiter ein Verfahren zur Wiederherstellung eines tierischen Embryos beschrieben, bei dem generell ein Kern mit einem diploiden Chromosomensatz in eine enukleierte Eizelle überführt wird, die in dem Metaphasenstadium II gehalten wird, wobei die Eizelle beim Einbringen des Kerns erst nach einer gewissen Zeit aktiviert wird. Durch später erfolgende Aktivierung der Eizelle nach Einbringen der Kern-DNA soll eine
35 verbesserte Reprogrammierung der eingebrachten Kern-DNA erreicht werden.

Die WO 97/0669 betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Wiederherstellung eines tierischen Embryos, bei dem der Kern einer "quiescent" (ruhenden) Donorzelle in eine geeignete

Empfängerzelle transferiert wird. Gemäß dieser Druckschrift wird es als erforderlich angesehen, daß die Donorzelle vor Vereinigung mit der Empfängerzelle in der G0-Phase festgesetzt wird, was durch Hungern der Zellen oder Kontaktinhibition erreicht werden kann.

5

Ein Problem bei dieser Technologie besteht jedoch immer noch darin, geeignete Spenderzellen für den Kerntransfer zu finden, mit der sich ein tierischer Embryo am zweckmäßigsten und wirtschaftlichsten herstellen läßt. Bekanntermaßen stellt die Reprogrammierung der Kern-DNA aus der jeweils gewählten Spenderzelle die größte Schwierigkeit bei der Embryoklonierung dar, da diese nicht nur Einfluß hat auf die weitere frühe Reifung des Embryos, sondern auch auf die spätere Entwicklung nach einer gegebenenfalls durchgeführten Einpflanzung in ein Muttertier. So bestehen trotz aller Erfolge auf diesem Gebiet immer noch Probleme hinsichtlich einer effektiven Reprogrammierung der Spender-Kern-DNA, um die manipulierte Eizelle mit neuem Kern dem Zustand einer natürlichen Zygote anzunähern. Dies drückt sich u.a. in einer äußerst geringen Ausbeute hinsichtlich der Gewinnung embryonaler Blastozysten und einer geringen Teilungsrate aus.

10

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden und eine geeignete Kern-Spenderzelle zur Verfügung zu stellen, mit der ein verbessertes Verfahren zum Klonieren von Tieren bereitgestellt werden kann.

20

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Klonieren eines tierischen Embryos, bei dem als Spenderzelle für den Kerntransfer fetale Fibroblasten eingesetzt werden. Der Kern dieser Zelle wird mit einer geeigneten Empfängerzelle zusammengebracht und die so erhaltene Zelle wird für einen Zeitraum gezüchtet, damit sich eine Morula bildet. Die daraus erhältliche Morula kann dann gegebenenfalls zum Klonieren wiederverwendet werden und zum Austragen in ein Muttertier eingebracht werden.

25

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Empfängerzelle eine enukleierte Eizelle, in die der Kern des fetalen Fibroblasten zum Kerntransfer eingebracht werden kann oder mit der der fetale Fibroblast selbst fusioniert wird. Der fetale Fibroblast kann dabei aus einem Fetus und direkt oder nach längerem Züchten verwendet werden.

30

35

Die Tiere, bei denen das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann, sind beispielsweise Ungulaten, Kaninchen, Nager, oder Vögel, wobei Ungulaten, insbesondere Schweine, Schafe, Ziegen, Rinder bzw. Kühe bevorzugt sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in dem Verfahren eingesetzten fetal-
Fibroblasten transgen, d.h. sie enthalten ein oder mehrere Gene, die entweder von einer
exogenen Quelle abgeleitet sind oder die ein endogenes, an einen anderen, nicht
5 natürlichen Locus im Genom eingebrachtes Gen darstellen. Diese Gene codieren vorzugs-
weise für ein Arzneimittel, beispielsweise einen Antikörper oder einen ernährungs-
physiologisch interessanten Stoff, beispielsweise Chymosin oder Trypsin, wobei die Gene
jeweils unter der Kontrolle eines oder des endogenen oder eines exogenen Promotors
liegen können.

10

Zur Gewinnung fetaler Fibroblasten werden Feten aus graviden Tieren gewonnen, bei-
spielsweise durch einfaches Zerkleinern des Fetus. Die aus dem Fetus gewonnen Zellen
werden sodann auf die gewünschten fetal-
Fibroblasten selektiert, wie beispielsweise
durch Anhaftenlassen an das Kulturgefäß und Abtrennen des Überstandes oder durch
15 mechanische Selektion mittels einer Pipette. Fetale Fibroblasten lassen sich aufgrund ihres
Phänotyps von anderen Zellen leicht unterscheiden.

20

Für die nachfolgenden Schritte kann der gewonnene fetale Fibroblast als solcher eingesetzt
werden, oder der Kern kann daraus isoliert und weiterverwendet werden.

25

Als Empfängerzellen werden in der Regel enukleierte Eizellen eingesetzt, die in vivo oder
in vitro gereift sind. So können beispielsweise in vitro gereifte, unbefruchtete Eizellen ein-
gesetzt werden, bei denen nach Erreichen der Metaphase II die umgebenden Cumulus-
zellen entfernt wurden.

30

Die Empfängerzelle soll vorzugsweise keine eigene Kern-DNA aufweisen. Für die
Entfernung der Eizell-DNA sind im Stand der Technik mehrere Möglichkeiten vorhanden,
wie beispielsweise die Trennung der Eizelle in zwei Hälften, von denen eine Hälfte keinen
Kern mehr aufweist und weiterverwendet werden kann, oder eine Bestrahlung mit
ultraviolettem Licht zur Zerstörung der zelleigenen DNA. Eine Entfernung des Kerns
bzw. der Pro-Nuclei oder der Metaphasen-Platte mittels Mikromanipulation ist ebenfalls
möglich. Als bevorzugt hat sich eine Behandlung der Eizellen vor der Mikromanipulation
mit Cytochalasin B mit anschließendem Absaugen des in der Nähe des Polkörperchen liegen-
den Zytoplasmas mit Hilfe einer Pipette, beispielsweise mit einem Leitz-Micromanipulator
35 (Leica, Bensheim, Deutschland) geführt, erwiesen. Da die Kern-DNA der Eizelle zu die-
sem Zeitpunkt in der Nähe der Polkörperchen lokalisiert ist, ist die E nukleationsrate bei
dieser Methode sehr hoch, wobei gleichzeitig nur ein kleiner Teil des Cytoplasmas mit ab-
gesaugt wird.

Nach Gewinnen der jeweils beim Kerntransfer beteiligten Zellen können generell zwei Wege beschritten werden. Der Kern des fetalen Fibroblasten wird anhand im Stand der Technik bekannter und etablierter Verfahren isoliert und in die vorbereitete Empfängerzelle eingebracht, wie beispielsweise mittels Injektion oder der fetale Fibroblast selbst wird mit der Empfängerzelle fusioniert.

Bei einer Fusion kann ein fetaler Fibroblast mit Hilfe einer geeigneten Vorrichtung, wie einer Transferpipette unter die Zona pellucida der enukleierten Eizelle geschoben und dort abgesetzt werden. Zur Integration des Zellkerns des fetalen Fibroblasten in das Zellplasma der Eizelle wird die Membran der Fibroblast mit der Membran der Eizelle fusioniert. Techniken zur Fusion von Zellen sind im Stand der Technik wohlbekannt, beispielsweise Fusion unter Verwendung des Sendai-Viruses, Behandlung mit PEG (Polyethylenglycol), Laserfusion oder Elektroschock. Die letztgenannte Methode, die sogenannte Elektrofusion, bei der durch gegebenenfalls mehrmalige, beispielsweise 2 bis 10 mal, kurzzeitige Gleichstrompulse von etwa 1 bis 5 kV/cm, vorzugsweise 1 bis 3 kV/cm, mit einer jeweiligen Dauer von 2 μ sek. bis 1 sek., Poren induziert werden, die ein Zusammenfließen des Zytoplasmas ermöglichen, ist in dem vorliegenden Verfahren bevorzugt, da die elektrischen Pulse bei geeigneter Stärke gleichzeitig eine Aktivierung der (fusionierten) Eizelle mit sich bringen können. Die Aktivierung kann auch einige Stunden (ca. 2-5 Std.) nach der Fusion erfolgen, beispielsweise durch eine Inkubation der fusionierten Zelle in einer 7 %igen Alkohollösung, vorzugsweise einer 7 %igen Ethanollösung, oder anhand anderer im Stand der Technik bekannten Verfahren.

Die Aktivierung der fusionierten Zelle ist ein wichtiger Schritt, da sie die Voraussetzung für das Ingangkommen der Teilungsaktivität des Fusionsproduktes ist. Nach erfolgter Fusion und Aktivierung werden die Fibroblasten-Eizellenkomplexe (Kerntransferembryonen) gezüchtet, bis sie ein Stadium erreichen, in dem sie gegebenenfalls auf einen Empfänger transferiert werden können. Dabei können dem verwendeten Kulturmedium nach Wahl Stoffe zugesetzt werden, die die Aggregation von Mikrotubuli unterstützen oder inhibieren. Nocadazol sowie Colcemid sind Beispiele für die Aggregation inhibierende Mittel, Taxol ist ein Mikrotubuli-Stabilisator. Diese Stoffe verhindern eine gegebenenfalls auftretende Bildung mehrerer Pro-Nuclei.

Bei den bestehenden Verfahren des Standes der Technik mußten zur weiteren Züchtung der sich bildenden Embryonen diese sorgfältig in einen Zwischenempfänger überführt werden. Dies wurde im allgemeinen dadurch erreicht, daß der Embryo in einem schützenden Medium, wie Agar, verpackt in die Eileiter eines "einstweiligen Muttertiers" (temporärer

- Empfänger) überführt wurde, in dem eine weitere Entwicklung bis zur Einpflanzung in das (endgültige) Muttertier erforderlich war. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es jedoch auch möglich bestehende in-vitro-Systeme für die Kultivierung einzusetzen ohne dabei die Ausbeuten zu verschlechtern. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, könnte
- 5 diese Tatsache mit der getroffenen Auswahl der Spenderzelle einhergehen, mit der Embryonen erhalten werden können, die hinsichtlich Ihrer Entwicklung natürlich erzeugten Embryonen sehr nahe kommen. Die Zellen werden für einen Zeitraum in Kultur gehalten, bis sich Blastozysten bilden. Dies umfaßt einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen, vorzugsweise 6 bis 7 Tagen.
- 10 Erfindungsgemäß ist es nun möglich, klonierte Embryonen zu Feten heranwachsen zu lassen, die dann wieder als Kernspender herangezogen werden können. Im Rahmen dieser sogenannten Reklonierung kann die Zahl an klonierten Embryonen weiter erhöht werden.
- 15 Die fetalen Fibroblasten zum Einsatz in dem erfindungsgemäßen Verfahren können aus einer Vielzahl von Tieren gewonnen werden, wie beispielsweise aus Säugern, Ungulaten, Kaninchen, Nagern, wie beispielsweise Ratten oder Mäusen, oder Vögeln, wie beispielsweise Enten, Gänsen oder Hühnern. Dabei sind u.a. im Hinblick auf wirtschaftliche Gesichtspunkte Ungulaten bevorzugt, wie beispielsweise Rinder, Schafe, Ziegen, Büffel,
- 20 Kamele sowie Schweine. Am meisten bevorzugt sind Schafe bzw. Kühe.
- Um die Isolierung des Genprodukts zu erleichtern kann das Genprodukt in ein Produkt des Tieres selbst gerichtet werden, bei Kühen bzw. Schafen beispielsweise in die Milch oder bei Vögeln in die Eier. Dies kann durch Wahl geeigneter Promotoren zur organspezifischen Expression erreicht werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Das Gen-
- 25 produkt kann jedoch gleichermaßen aus dem Tier selbst gewonnen werden, beispielsweise aus dem Serum. Auch ist es möglich, daß das/die Organ(e)/Gewebe der Tiere das gewünschte Produkt darstellen, wobei, beispielsweise für eine (Xeno-)Transplantation.
- 30 Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten fetalen Fibroblasten bzw. die Feten oder Tiere, von denen sie abgeleitet sind, können darüber hinaus transgen sein, wobei das Transgen vorzugsweise für ein ernährungsphysiologisch oder pharmazeutisch interessantes Produkt, beispielsweise einen Antikörper codiert. Beispielsweise können bei Kühen oder Schafen die Gene für Chymosin oder Trypsin in ein Konstrukt eingebaut werden, das die
- 35 Produktion des entsprechenden Enzyms, bzw. eines seiner Vorläufer in der Milch des Tieres ermöglicht. Das Transgen von Interesse kann dabei, je nach Wunsch, unter der Steuerung eines exogenen, ebenfalls transgenen Promotors liegen, oder ein bekannter endogener Promotor kann für diesen Zweck eingesetzt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nun möglich, eine Verbesserung der Gewinnung homologer tierischer Proteine, eine Veränderung tierischer Produkte, wie Milch selbst oder die Gewinnung tierischer Organe für beispielsweise einen medizinischen Einsatz zu erreichen.

Eine ganze Reihe von Proteinen wird bislang aus tierischen Organen durch Aufreinigung aus diesen Organen gewonnen und dann in der Medizin oder Technik eingesetzt. Probleme dabei bestehen u.a. hinsichtlich der relativen Mengen, in denen sie in diesen Geweben vorhanden sind (beispielsweise FSH aus Hypophysen), was zu hohen Produktionskosten führt, da zur Gewinnung einerseits eine große Menge an Ausgangsmaterial, d.h. viele Tiere, erforderlich sind, was aufgrund der Vielzahl von Tieren die Gefahr einer Kontamination, mit beispielsweise Krankheitserregern, wie BSE oder Ehec, mit sich bringt.

Beispiele für interessierende Proteine aus Tierorganen sind Aprotinin aus der Lunge, Chymosin aus dem Magen, Katalase aus der Leber, Elastase, Pankreatin, Insulin oder Trypsin aus dem Pankreas, Hyaluronidase aus Hoden, Chondroitin aus Trachea, Kollagene aus der Haut, Fibronectin oder Vitronectin aus Plasma, Epithelial Cell Growth suppl. oder LH (Luteinisierendes Hormon) aus der Hypophyse, Fibroblast growth factor oder Ganglioside aus dem Hirn, sowie Hämoglobin, Thrombin, Transferrin usw.. Diese Aufzählung ist nicht als Einschränkung anzusehen.

Für alle diese Produkte kann eine ektopische Expression, d.h. eine Expression in einem anderen Gewebe, beispielsweise in der Milchdrüse erreicht werden, wenn in den für die Klonierung verwendeten Zellen vorher entweder ein additiver Gentransfer durchgeführt wurde, beispielsweise über Injektion, Transformation, Transfektion oder anhand eines anderen im Stand der Technik bekannten Verfahrens, wobei ein in vitro rekombiniertes Genkonstrukt zusätzlich ins Genom integriert wird. Darüber hinaus kann durch homologe Rekombination in den Zellen erreicht werden, daß das endogen vorhandene Gen mit einem Promotor gekoppelt wird, der für dieses Strukturgen ein anderes Expressionsmuster ergibt, beispielsweise Produktion von Chymosin im Euter mit einhergehender Sezernierung in die Milch anstelle der endogenen Synthese im Magen. Weiter kann ein endogen vorhandener Promotor, beispielsweise der Casein- oder Lactoglobulin-Promotor mit einem neuen Strukturgen gekoppelt werden, so daß für die Expression optimale Bedingungen vorliegen. In beiden vorstehend aufgeführten Fällen können Promotor und Strukturgen, die homolog in das Genom hinein rekombiniert werden, vorab aus einer Genbank isoliert werden, die beispielsweise aus fetalen Fibroblasten gewonnen worden ist, so daß nicht nur

spezieseigene DNA (Selbstklonierung) eingesetzt wird, sondern es sich auch um isogene DNA handelt.

5 Auf diesem Weg kann daher die Zusammensetzung von Nahrungsmitteln, die aus tierischen Produkten, wie beispielsweise Milch, gewonnen werden, in gewünschter Weise verändert werden, so daß diese positive alimentäre, dietätische, gesundheitsfördernde Eigenschaften oder ein geringeres allergenes Potential, bessere Lagerungsstabilität oder Verarbeitungseigenschaften aufweisen. So kann beispielsweise Milch mit Ehec-Antikörpern oder Milch mit speziell auf Erkrankungen, wie beispielsweise Leaktoseintoleranz, 10 abgestimmten Eigenschaften hergestellt werden.

Darüber hinaus können durch Verwendung von MACs (Mammalian artificial Chromosomes) Integrationsmutationen vermieden und große DNA-Fragmente transferiert werden. Dieses MACs werden als zusätzliche Mini- bzw. Mikrochromosomen im Kern genauso 15 repliziert, wie die endogenen Chromosomen. Dadurch ist es beispielsweise möglich, über die Spezies hinweg Gencluster zu transferieren, beispielsweise komplette Immunglobulin-Gencluster des Menschen auf Nutztiere, wobei dieses Nutztier dann in der Lage wäre, humane Antikörper zu produzieren, die gewonnen und genutzt werden könnten. Der Transfer bestimmter MACs aus der eigenen Spezies führt weiter dazu, daß bei additiven 20 Geneffekten eine Erhöhung der Synthese des Genprodukts folgern würde.

Wichtig ist auch eine Expression homologer Proteine, bzw. auch Geweben oder Organen in Nutztieren, bei Proteinen in den gleichen Organen, in denen diese Proteine auch beim Menschen exprimiert werden. Die Proteine werden dann anhand im Stand der Technik 25 bekannter Verfahren gewonnen, die Gewebe bzw. Organe vor einer eventuellen Transplantation aus dem Tier entnommen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht in einer hohen Identität der exprimierten Proteine, da sie im richtigen Organ prozessiert bzw. post-translational modifiziert werden, beispielsweise Expression von Erythropoietin in der Niere. Die führt dazu, daß die aus den unterschiedlichen Geweben gewonnenen Proteine 30 die gleiche Glycosylierung aufweisen, wie die Stoffe im Menschen selbst, wobei deren Aktivität der des natürlichen Proteins sehr nahe kommt. So können transgene Tiere, beispielsweise Schweine, Rinder usw. erhalten werden, die menschliches Insulin, Erythropoietin usw. produzieren, die in der Medizin dann besser genutzt werden können.

35 Anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens kann ein einmal transgen gemachtes Nutztier mit beispielsweise den vorstehend aufgeführten Eigenschaften stabil fortgepflanzt werden.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen geklonten Tiere, die, wie oben erläutert transgen sein können oder nicht.

- Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist neben Umgehung des Erfordernis die
5 Zellen in die G0 Phase zu bringen auch eine gleichbleibende und sogar gesteigerte Effizienz hinsichtlich der Ausbeuten bei der Reklonierung.

- So konnten unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens Ergebnisse erzielt werden, die sogar besser waren als jene, die aus punktierten Oozyten mit anschließender
10 Reifung und Fertilisation - jedoch ohne Klonierung - entstanden sind. Die dabei beobachtete höhere in vivo Entwicklungskapazität erhöht die Effizienz der Klonierungsprogramme erheblich.

- Als Maß für die Effizienz derartiger Verfahren kann die sogenannte Graviditätsrate (Trächtigkeitsrate) dienen, die als Anteil der nach Transfer von 6 - 7 Tagen in vitro kultivierten Embryonen auf synchronisierte Empfängertiere gravid gewordenen Tiere
15 ermittelt werden kann. Die jeweiligen Graviditätsraten können durch Messung des Progesteronspiegels, Ultraschalluntersuchungen oder mittels rektaler Palpation bestimmt werden.

- 20 Dabei wurden beim Beispiel Rind mit unterschiedlichen Verfahren folgende Ergebnisse erhalten:

<u>Graviditätsraten:</u>		
25	Oocytenpunktion mit anschließender IVM und IVF	34 %
	Embryoklonierung (durchschnittlich)	25 %
	Embryoklonierung mit fetalen Fibroblasten	55 %

- 30 IVM = in vitro Maturation/Reifung
IVF = in vitro Fertilisation

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf das lediglich zur Erläuterung gegebene Beispiel ausführlicher erläutert, das den Bereich der Erfindung nicht einschränken soll.

Beispiel**Isolierung fetaler Fibroblasten beim Rinderfetus**

- 5 Feten aus Uteri von geschlachteten Kalbinnen oder Kühen wurden freipräpariert und in PBS (Phosphate buffered Saline, ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, mit Penicillin/ Streptomycin, plus 10% fetales Kälberserum (FCS)) auf Eiswasser ins Labor gebracht. Die Feten wurden anschließend mehrmals mit frischem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Feten vom Kopf und den inneren Organen befreit, nochmals in PBS gewaschen, in 5 ml PBS zer-
- 10 kleinert und in ein 50 ml Kulturröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml PBS wurde bei 300 Upm für 5 min vorsichtig zentrifugiert und das Pellet in 0,1 %iger Trypsinlösung resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte ein Transfer in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen, worauf erneut zentrifugiert wurde (300 Upm/5 min.). Diese Schritte, beginnend mit der Trypsinbehandlung wurden zweimal wiederholt. Die so er-
- 15 haltene Zellsuspension wurde dann filtriert, in ein 50 ml Röhrchen übernommen, für 5 min. zentrifugiert (160 g), das Pellet resuspendiert und in 1 ml Kulturmedium (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (Gibco), ergänzt mit 15% FCS, 2mM L-Glutamin, 10^{-7} mMol β -Mercaptoethanol, und Penicillin/Streptomycin) aufgenommen.
- 20 Nach der Trypsinbehandlung wurde die Zellsuspension in 10 cm Kulturschalen gegeben und in Kulturmedium (supra) mit 10 % FCS (Biochrom, Berlin) solange gezüchtet (37°C, 5 % CO_2), bis der Zellrasen subkonfluent war (2 bis 3 Tage). Ein Teil dieser Passage "0" wurde eingefroren (10 % Dimethylsulfoxid, Sigma) und in flüssigem Stickstoff gelagert.
- 25 Als Vergleich hinsichtlich der Effizienz des Verfahrens wurde ein Teil der Fibroblasten vor dem Kerntransfer nach dem in der WO 97/07669 (Campell et al.) beschriebenen Verfahren durch starke Verringerung der Serumkonzentration in der Kultur in eine presumptive G0-Phase synchronisiert. Dazu wurden Zellen einen Tag nach der Passage dreimal mit PBS gewaschen und dann in frischem Medium mit 0,5 % FCS für 8 Tage
- 30 gezüchtet (Starvation, "gehungerte Zellen"), bevor sie für die Klonierung verwendet wurden. In dem von Campell beschriebenen Verfahren wird es als unumgänglich angesehen, daß die eingesetzten Fibroblasten durch "Hungern" oder andere Verfahren in die G0-Phase überführt werden.
- 35 Die Fibroblasten für das hier beschriebene Verfahren, die diesem Aushungerungsprozeß (Starvation) nicht ausgesetzt wurden, wurden direkt aus der subkonfluenten Zellkultur entnommen und ohne weitere Behandlung für die Klonierung verwendet.

Weiter wurden Blastomeren (Embryonalzellen) aus Morulae (Embryonen im Alter von etwa 6 Tagen mit einer Zellzahl zwischen 30 und 70 Blastomeren), die aus der Klonierung mit gehungerten und nicht behandelten Fibroblasten entstanden sind, erneut für die Klonierung verwendet (Reklonierung). Die Ergebnisse sind in der Tabelle
5 zusammengestellt und zeigen, daß trotz Arbeiten gegen die Lehre des Standes der Technik sogar bessere Ergebnisse erhalten werden können.

Auch bei den erhaltenen Graviditätsraten konnte überraschenderweise festgestellt werden, daß diese bei 60 % lag.

10

Additiver Gentransfer

In vitro rekombinierte Genkonstrukte, wie sie in der DE-OS-40 12 526 beschrieben sind, die hier unter Bezugnahme mit aufgenommen wird, werden durch konventionelle DNA-
15 Mikroinjektion (Brem G., Transgenic Animals, Genetic Engineering of Animals, VCH Weinheim (1993), 83-170) in die Kerne isolierter fetaler Fibroblasten oder durch bekannte Transformationsverfahren (Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) stabil integriert. Der Nachweis der Integration in den Zellen erfolgt mittels PCR und/oder Southern Blotting (Maniatis, vorstehend). Eine
20 Expression in ausdifferenzierten Zellen zeigt, daß der Gentransfer erfolgreich gewesen ist.

Klonierung

18-20 Std. nach dem Beginn der Reifung wurden aus dem Eierstock isolierte bovine
25 Oozyten von den sie umgebenden Kumuluszellen befreit und innerhalb von zwei Stunden enukleiert (Molecular Reproduction and Development 42 (1995), 53-57). Ca. 20-22 Stunden nach Beginn der Reifung wurden wie vorstehend gewonnene fetale Fibroblasten mittels einer Transferpipette in den perivitellinen Raum von enukleierten Oozyten überführt und die sich dabei bildenden Karyoplast-Zytoplast-Komplexe (KZK) wurden
30 jeweils für 10 µsek. einem doppelten elektrischen Puls von 2,1 kV/cm ausgesetzt, um die Fusion zu induzieren. Die KZKs wurden in Ham's F-12 Medium (Sigma) mit 10% FCS in einem Brutschrank gezüchtet. Die Fusion wurde 30 bis 60 Minuten nach dem Fusionspuls durch mikroskopische Untersuchung beurteilt.

35 24 Stunden nach Beginn der Reifung wurden die KZKs durch eine 5 minütige Inkubation in 7% Ethanol aktiviert und anschließend 5 Stunden in 10 µg/ml Cycloheximid (Sigma C-7698) und 5 µg/ml Cytochalasin B (Sigma C-6762) gezüchtet. Anschließend wurden die KZKs in einem 100 µl Tropfen CR-1 Medium (Rosenkrans und First, 1991) mit 10%

Östrus-Kuh-Serum umgesetzt. Die Tropfen wurden mit Paraffin-Öl überschichtet und für 7 bis 8 Tage bei 39°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ gezüchtet.

5 Tabelle 1: Morulae aus fetaler Fibroblastenklonierung (FFB) als Kernspender

Kerntransfer-Morulae aus Klonierung	KZK	Fusionierte FFB (%)	Teilung (%)	Blastozysten (%)
FFB (nicht gehungert)	65	58 (89%)	50 (86%)	32 (55%)
FFB (gehungert)	102	91 (88%)	73 (80%)	47 (52%)

Wie aus vorstehender Tabelle ersichtlich, war es bereits bei dem ersten Versuch möglich, eine Teilungsrate bis zu 86 % und eine Blastozystenrate von bis zu 55 % zu erhalten. Dies ist im Hinblick darauf, daß es im Stand der Technik als erforderlich angesehen wird die Fibroblasten "auszuhungern", als überraschend anzusehen, da Ergebnisse erzielt werden können, die gegenüber dem Stand der Technik sogar besser sind.

Embryotransfer

15

Empfängermanagement

Als Empfänger wurden Kalbinnen verwendet, die folgende Kriterien erfüllen:

1. Aufzucht in IBR (bovines Herpesvirus Typ 1) unverdächtigen Betrieben;
- 20 2. serologische Untersuchung auf BHV-1-Antikörper (infektiöse bovine Rhinotracheitis / infektiöse pustulöse Vulvovaginitis) negativ;
3. serologische Untersuchung auf BVD (bovine Virus Diarrhoe)/MD-Antigen (Mucosal Disease) negativ;
4. dem Alter (13-16 Monate) entsprechende Körpermasseentwicklung;
- 25 5. eingetretene Geschlechtsreife; bei Tieren, die den Embryo austragen sollen, eingetretene Zuchtreife;
6. gynäkologische Untersuchung ohne pathologische Befunde;

Alle Empfänger erhielten unmittelbar nach Aufstallung Mineralstoffboli (All Trace, Ranching Consult GmbH), um die erfahrungsgemäß unzureichende Versorgung mit Selen, Kupfer und Cobalt auszugleichen (Wittkowski et al., Zur Selensupplementierung bei

30

Färsen; Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer Deutschland (AET-d).
13.06.-14.06.1996, Marktredwitz).

- 5 BVD-Antikörper negative Tiere werden gegen BVD/MD immunisiert (Rumilis®, Intervet),
um das Infektionsrisiko bei Übertragung von Embryonen (Mödl et al., Control of bovine
viral diarrhoea virus in abattoir ovaries for in vitro fertilization (IVF) or cloning programs;
11e Reunion A.E.T.E.-Hannover, 8-9 September 1995) bzw. nach Verbringen in
Stallungen mit unbekanntem BVD-Status zu minimieren. Die Fütterung erfolgte ad libitum
mit Grassilage, Heu und Stroh. Entwurmungen wurden im Frühjahr und Herbst mit
10 Ivermectin (Ivomec®, MSD Agvet) durchgeführt. Die Unterbringung der Empfänger
erfolgt zum Teil in Laufstall- (Offenstall, Gruppengröße 6 Tiere) und zum Teil in
Anbindehaltung.

Empfängervorbereitung

- 15 Die Übertragung der in vitro hergestellten Embryonen erfolgt auf Zyklus-synchrone
Empfänger, d.h. das Stadium des Sexualzyklus entspricht dem Alter der zu übertragenden
Embryonen. Dabei wird der Tag der Brunst als Zyklustag 0 bezeichnet. Die Brunst-
synchronisation erfolgt im Diöstrus durch die einmalige intramuskuläre Applikation eines
20 Prostaglandin F₂- α -Analogons (2,0 ml Estrumate®, Mallinckrodt Veterinary). Kalbinnen,
bei denen mittels rektaler Palpation kein funktionelles Corpus luteum diagnostizierbar
war, wurden nicht für die Brunstsynchronisation verwendet. Die Brunst tritt erfahrungs-
gemäß 2-3 Tage post applicationem ein und wird anhand des Brunstverhaltens und des
Scheidenbefundes beurteilt.

25

Embryotransfer

- Die in vitro produzierten Embryonen wurden nach 7-tägiger Kultur auf geeignete
Empfänger transferiert. Dazu wurden die Embryonen identifiziert, qualitativ beurteilt,
30 Zona geschlitzt, in ein geeignetes Transfermedium umgesetzt und anschließend in
Minipailletten (Minitüb) aufgezogen. Als Transfermedien wurden PBS + 10% fetales
Kälberserum (FCS, Biöchrom), Ovum Culture Medium (ICP, Neuseeland) + 10% FCS
oder TL-Hepes + 10% FCS verwendet.

- 35 Die verschlossenen Pailletten wurden bis zum Transfer, der innerhalb von ca. 90 Minuten
stattfinden sollte, bei 37,8°C in einem Miniinkubator gelagert.

Die Eignung der Empfänger wurde anhand folgender Kriterien beurteilt:

Die Tiere wurden etwa 7 Tage vor dem Transfer in Brunst beobachtet, wobei die Asynchronität 24 Std. nicht überschreiten soll (Hasler et al., *Theriogenology* 43 (1995), 141-152). Das Vorhandensein und die Größe eines funktionellen Gelbkörpers wurde
5 entsprechend bewertet (Assey et al., *Theriogenology* 39 (1993), 1321-1330).

Die verwendeten Tiere wiesen keine Anzeichen einer Erkrankung des Genitaltraktes auf.

10 Nach der Auswahl wurde eine Epiduralanästhesie (2,0 ml Lidocain®, Albrecht) vorgenommen und das äußere Genitale sorgfältig mit trockenem Papier gereinigt. Anschließend wurde der körperwarme Transferekatheter (Minitüb) mit einer Paillette beschickt und mit einer Plastikschtzülle (Sanisheath, Minitüb) versehen. Der Transfer erfolgte unblutig unter rektaler Kontrolle der Cervixpassage und der Katheterposition in die Spitze des ipsi-
15 lateralern Uterushornes (Reichenbach et al., *J. Reprod. Fertil.* 95 (1992), 363-370). Dabei wurde die Plastikschtzülle erst am äußeren Muttermund mit dem Transferekatheter perforiert, um eine Keimverschleppung aus der Vagina in den Uterus zu vermeiden. War der Transfer mehrerer Embryonen auf einen Empfänger vorgesehen, so wurden diese bilateral abgesetzt. Dazu wurde der Transferekatheter bis in das Corpus uteri zurückge-
20 zogen, der Mandrin mit der entleerten Paillette entfernt, eine neue Paillette mit Embryo(nen) in den Katheter geschoben und im contralateralen Uterushorn positioniert. Unmittelbar nach dem Transfer wurden alle relevanten Daten (Lebensnummer des Empfängers, Herkunft, Anzahl und Qualität der Embryonen usw.) dokumentiert.

25 Trächtigkeitsuntersuchung

21 Tage nach der Brunst, also 14 Tage nach dem Embryotransfer, wurde eine Brunstkontrolle vorgenommen und der Progesteron Gehalt im Blutserum festgestellt. Werte unter 0,1 ng/ml werden als nicht trächtig angesehen. Bei Progesteronwerten über 2,0 ng/ml
30 kann mit einer Trächtigkeit gerechnet werden. Die erste direkte Trächtigkeitsuntersuchung wurde um den 35. Tag mittels Ultraschall und die zweite manuell um den 42. Trächtigkeitstag vorgenommen.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung eines tierischen Embryos, das die folgenden Schritte umfaßt:
- (a) Gewinnen eines fetalen Fibroblasten,
 - (b) Vereinen des Kerns des fetalen Fibroblasten mit einer geeigneten Empfängerzelle, wobei der fetale Fibroblast vor der Vereinigung nicht durch externe Manipulation in der
 - 10 G0 Phase festgesetzt wird,
 - (c) Züchten der so erhaltenen Zelle für einen Zeitraum, damit sich eine Blastozyste bildet, und gegebenenfalls
 - (d) Einbringen des gewachsenen Zellhaufens in ein Muttertier.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die geeignete Empfängerzelle eine enukleierte Eizelle ist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der fetale Fibroblast mit der geeigneten Empfängerzelle fusioniert wird.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem der in Schritt (a) eingesetzte fetale Fibroblast von den in Schritt (d) gewonnenen Zellen abgeleitet ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die fetalen Fibroblasten von Tieren abgeleitet sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ungulaten, Kaninchen, Nagern, oder Vögel.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Tiere Ungulaten sind.
7. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem das Tier ein Rind ist.
- 30 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der fetale Fibroblast transgen ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die fetale Fibroblast ein pharmazeutisch oder ernährungsphysiologisch interessantes Gen enthält.
- 35

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, bei dem das Genprodukt des eingebrachten Gens in die Milch sezerniert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem das Transgen Chymosin oder Trypsin ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, bei dem das Transgen unter der Kontrolle eines endogenen Promotors liegt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, bei dem das Transgen oder ein endogenes Gen unter der Kontrolle eines exogenen Fremdpromotors oder eines Spezies-endogenen Promotors liegt.
14. Tiere, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/00230

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/00 A01K67/027 C12N9/64		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A01K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHNIEKE, A.E. ET AL.: "Human Factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts" SCIENCE., vol. 278, no. 5346, 19 December 1997, pages 2130-2133, XP002067036 LANCASTER, PA US --- see the whole document	14
A	--- see the whole document	1-6, 8
X	WO 97 07669 A (ROSLIN INST EDINBURGH; CAMPBELL KEITH HENRY STOCKMAN (GB); WILMUT) 6 March 1997 cited in the application see the whole document --- -/--	14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">2 October 1998</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">13/10/1998</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Chambonnet, F</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/00230

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WILMUT, I. ET AL.: "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells"</p> <p>NATURE.,</p> <p>vol. 385, no. 6619, 27 February 1997, pages 810-813, XP002067035</p> <p>LONDON GB</p> <p>see the whole document</p>	14
X	<p>CHESNE P ET AL: "NUCLEAR TRANSFER IN CATTLE: BIRTH OF CLONED CALVES AND ESTIMATION OF BLASTOMERE TOTIPOTENCY IN MORULAE USED AS A SOURCE OF NUCLEI"</p> <p>LIFE SCIENCES,</p> <p>vol. 316, 1993, pages 487-491, XP000197855</p> <p>see the whole document</p>	14
A	<p>see the whole document</p>	7
A	<p>CAMPBELL K H S ET AL:</p> <p>"NUCLEAR-CYTOPLASMIC INTERACTIONS DURING THE FIRST CELL CYCLE OF NUCLEAR TRANSFER RECONSTRUCTED BOVINE EMBRYOS: IMPLICATIONS FOR DEOXYRIBONUCLEIC ACID REPLICATION AND DEVELOPMENT"</p> <p>BIOLOGY OF REPRODUCTION,</p> <p>vol. 49, no. 5, November 1993, pages 933-942, XP000604579</p> <p>see the whole document</p>	1
A	<p>GADBOIS, D.M. ET AL.: "Multiple kinase arrest points in the G1 phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,</p> <p>vol. 89, September 1992, pages 8626-8630, XP002079365</p> <p>WASHINGTON US</p> <p>see the whole document</p>	1
A	<p>HEYMAN Y ET AL: "CLONING OF DOMESTIC SPECIES"</p> <p>ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE,</p> <p>vol. 42, no. 1/04, 1996, pages 427-436, XP000671884</p> <p>see page 431, paragraph 3.2</p> <p>see page 432, paragraph 3.4</p>	1
A	<p>OTAEGUI P J ET AL: "TRANSFER OF NUCLEI FROM 8-CELL STAGE MOUSE EMBRYOS FOLLOWING USE OF NOCODAZOLE TO CONTROL THE CELL CYCLE"</p> <p>MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT,</p> <p>vol. 39, no. 2, October 1994, pages 147-152, XP000604559</p> <p>see the whole document</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/00230

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	CIBELLI, J.B. ET AL.: "Cloned transgenic calves produced from non quiescent fetal fibroblasts" SCIENCE., vol. 280, no. 5367, 22 May 1998, pages 1256-1258, XP002079366 LANCASTER, PA US see the whole document ---	1-14
T	WO 98 37183 A (KIND ALEXANDER JARVIS ;PPL THERAPEUTICS SCOTLAND LTD (GB); SCHNIEK) 27 August 1998 see the whole document ---	1-6,8-10
T	WO 98 30683 A (UNIV MASSACHUSETTS A PUBLIC IN) 16 July 1998 see claims 1-10,12-27 -----	1-6,8,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/00230

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim 1 (d) and the relevant claims dependent thereon relate to a method for surgical treatment of the human or animal body, the search was completely carried out.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/00230

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9707669 A	06-03-1997	AU 6831096 A EP 0849990 A GB 2318578 A NO 980845 A PL 325331 A	19-03-1997 01-07-1998 29-04-1998 29-04-1998 20-07-1998
WO 9837183 A	27-08-1998	NONE	
WO 9830683 A	16-07-1998	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00230

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/00 A01K67/027 C12N9/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A01K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHNIEKE, A.E. ET AL.: "Human Factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts" SCIENCE., Bd. 278, Nr. 5346, 19. Dezember 1997, Seiten 2130-2133, XP002067036 LANCASTER, PA US	14
A	siehe das ganze Dokument	1-6,8
X	WO 97 07669 A (ROSLIN INST EDINBURGH; CAMPBELL KEITH HENRY STOCKMAN (GB); WILMUT) 6. März 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	14
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Oktober 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/10/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chambonnet, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. ionales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00230

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	<p>WILMUT, I. ET AL.: "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells" NATURE., Bd. 385, Nr. 6619, 27. Februar 1997, Seiten 810-813, XP002067035 LONDON GB siehe das ganze Dokument</p>	14
X	<p>CHESNE P ET AL: "NUCLEAR TRANSFER IN CATTLE: BIRTH OF CLONED CALVES AND ESTIMATION OF BLASTOMERE TOTIPOTENCY IN MORULAE USED AS A SOURCE OF NUCLEI" LIFE SCIENCES, Bd. 316, 1993, Seiten 487-491, XP000197855 siehe das ganze Dokument</p>	14
A		7
A	<p>CAMPBELL K H S ET AL: "NUCLEAR-CYTOPLASMIC INTERACTIONS DURING THE FIRST CELL CYCLE OF NUCLEAR TRANSFER RECONSTRUCTED BOVINE EMBRYOS: IMPLICATIONS FOR DEOXYRIBONUCLEIC ACID REPLICATION AND DEVELOPMENT" BIOLOGY OF REPRODUCTION, Bd. 49, Nr. 5, November 1993, Seiten 933-942, XP000604579 siehe das ganze Dokument</p>	1
A	<p>GADBOIS, D.M. ET AL.: "Multiple kinase arrest points in the G1 phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., Bd. 89, September 1992, Seiten 8626-8630, XP002079365 WASHINGTON US siehe das ganze Dokument</p>	1
A	<p>HEYMAN Y ET AL: "CLONING OF DOMESTIC SPECIES" ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, Bd. 42, Nr. 1/04, 1996, Seiten 427-436, XP000671884 siehe Seite 431, Absatz 3.2 siehe Seite 432, Absatz 3.4</p>	1
A	<p>OTAEGUI P J ET AL: "TRANSFER OF NUCLEI FROM 8-CELL STAGE MOUSE EMBRYOS FOLLOWING USE OF NOCODAZOLE TO CONTROL THE CELL CYCLE" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, Bd. 39, Nr. 2, Oktober 1994, Seiten 147-152, XP000604559 siehe das ganze Dokument</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00230

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>CIBELLI, J.B. ET AL.: "Cloned transgenic calves produced from non quiescent fetal fibroblasts"</p> <p>SCIENCE., Bd. 280, Nr. 5367, 22. Mai 1998, Seiten 1256-1258, XP002079366 LANCASTER, PA US siehe das ganze Dokument</p>	1-14
T	<p>WO 98 37183 A (KIND ALEXANDER JARVIS ;PPL THERAPEUTICS SCOTLAND LTD (GB); SCHNIEK) 27. August 1998 siehe das ganze Dokument</p>	1-6,8-10
T	<p>WO 98 30683 A (UNIV MASSACHUSETTS A PUBLIC IN) 16. Juli 1998 siehe Ansprüche 1-10,12-27</p>	1-6,8,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/ 00230

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 1 (d) und die entsprechenden davon abhängigen Ansprüche sich auf ein Verfahren zur chirurgischen Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche völlig durchgeführt.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00230

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9707669 A	06-03-1997	AU 6831096 A	19-03-1997
		EP 0849990 A	01-07-1998
		GB 2318578 A	29-04-1998
		NO 980845 A	29-04-1998
		PL 325331 A	20-07-1998
WO 9837183 A	27-08-1998	KEINE	
WO 9830683 A	16-07-1998	KEINE	

